

BUNDEREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17 (a) OR (b)



04 SEP 2000

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 199 40 426.7

Anmeldetag: 26. August 1999

Anmelder/Inhaber: TUTOGEN MEDICAL GMBH,
Neunkirchen a Brand/DE

Bezeichnung: Verfahren zum Dehydratisieren von biologischen
Gewebe zur Herstellung von Transplantat-
Konserven

IPC: A 01 N 1/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 10. August 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Seiter

1

5

Tutogen Medical GmbH
Industriestraße 6
91077 Neunkirchen a.Br.

B 3765 - T/D1

10

Verfahren zum Dehydratisieren von biologischen
Gewebe zur Herstellung von Transplantat-Konserven

15 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Dehydratisieren von
biologischen Geweben zur Herstellung von Transplantat-Konser-
ven.

Verfahren zum Dehydratisieren von biologischen Geweben zur
20 Herstellung von Transplantat-Konserven liefern autogene,
allogene oder xenogene Transplantate, die dem Chirurgen bei
Bedarf jederzeit zur Verfügung stehen.

Transplantate sollten eine dem Nativgewebe, zum Beispiel
Haut, Sehnen, Knochen, sehr ähnliche morphologische Struktur
aufweisen, und ihre Eigenschaften sollten weitgehend denen des
Nativgewebes entsprechen. Zu den erforderlichen Eigenschaften
gehören innere Oberfläche, Handhabbarkeit und Elastizität.
Darüberhinaus sind bei der Herstellung von Transplantatkonser-
30 ven auch noch weitere Kriterien zu beachten. Das Transplantat
muß im sterilen Zustand praktisch beliebig lang unter Erhalt
seiner Eigenschaften aufbewahrt werden können. Ferner muß es
eine gewisse Resistenz gegen den Abbau durch den Empfängeror-
ganismus haben, damit es als Leitschiene für einsprießendes
35 Gewebe fungieren kann.

Ein bekanntes Verfahren zum Dehydratisieren von biologischen

1

Gewebe zur Herstellung von Transplantat-Konserven bedient
sich der Gefriertrocknung. Das wasserhaltige Gewebe wird bei
5 ca. -25°C bis -40°C eingefroren und das entstandene Eis durch
Sublimieren im Vakuum entfernt. Das resultierende Gewebe weist
einen geringen Wassergehalt auf. In sterilem Zustand kann es
lange Zeit unter Erhalt seiner Eigenschaften aufbewahrt werden
und steht bei Bedarf als gebrauchsfertige Transplantat-Konser-
10 ve zur Verfügung.

15

20

Dieses Verfahren ist jedoch mit Nachteilen verbunden. Es ent-
stehen bei flächigen kollagenen Geweben, zum Beispiel der
Dura mater, relativ dicke schwammartige Materialien, was de-
ren Handhabung erschwert. Das kollagene Ausgangsgewebe ist
im feuchten Zustand ein gequollenes Fasergeflecht, und dieser
Zustand wird beim Tieffrieren fixiert. Die beim Einfrieren
zwischen Fasern und Fibrillen sich bildenden Eiskristalle
lockern das Fasergefüge. Bei der anschließenden Sublimation
entstehen Hohlräume im Gewebe, die dessen Eigenschaften, ver-
glichen mit dem nativen Gewebe, verschlechtern. Insbesondere
die Elastizität wird erheblich erniedrigt. Ferner wird infolge
partieller Verleimung der Fibrillen die innere Oberfläche dra-
stisch erniedrigt. Dadurch hat das resultierende Produkt bei
der Verwendung als Transplantat nur noch einen stark vermin-
derten Leitschieneneneffekt für einspritzendes Bindegewebe.

30

35

Wegen dieser Nachteile der Gefriertrocknung ist in der
DE 29 06 650 C2 ein Verfahren beschrieben, bei dem das kolla-
gene Gewebe mit einem organischen, mit Wasser mischbaren Lö-
semittel dehydratisiert wird. Bei diesem Verfahren findet
während der sukzessiven Extraktion des Wassers eine allmäh-
liche Entquellung des biologischen Gewebes statt, so daß die
native fibrilläre Struktur erhalten bleibt und Verleimungen
der Fibrillen nicht auftreten. Folglich entspricht die innere
Oberfläche des so dehydratisierten Gewebes derjenigen, die das
native Gewebe aufweist. Die Elastizität bleibt ebenfalls im

1

wesentlichen erhalten. Bei diesem Verfahren sind allerdings zur weitgehenden Dehydratisierung eine Anzahl von Extraktions-
5 schritten erforderlich, bei denen das Lösemittel immer wieder erneuert werden muß. Bei Spongiosa Knochen sind bis 20 Extraktionsschritte erforderlich. Dies stellt ein zeitlich aufwendiges Verfahren dar. Außerdem ist der häufige Wechsel des Lösemittels arbeits- und kostenintensiv. Ferner ist ein umweltschonendes Recyclingverfahren für das Lösemittel notwendig.
10

In der DE 38 35 237 C1 wird ein Verfahren beschrieben, bei dem Rinder-Pericard-Gewebe mit Aceton entwässert, an der Luft getrocknet, mit Wasser rehydratisiert und dann gefriergetrocknet wird. Erstens ist dieses Verfahren relativ umständlich,
15 und zweitens treten dieselben Nachteile auf, wie sie oben bei dem Verfahren der Gefriertrocknung geschildert wurden, da das rehydratisierte Gewebe gefriergetrocknet wird.

20 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zum Dehydratisieren von biologischen Geweben zur Herstellung von Transplantat-Konserven, bei dem einerseits die native Struktur des kollagenhaltigen Gewebes weitgehend erhalten bleibt und das andererseits weniger zeitaufwendig sowie weniger arbeits- und kostenintensiv ist.

Zur Lösung dieser Aufgabe wird ein Verfahren zum Dehydratisieren von biologischen Geweben zur Herstellung von Transplantat-Konserven vorgeschlagen, bei dem in einer ersten Stufe mit einem organischen, mit Wasser mischbaren Lösemittel das Gewebe
30 teilweise dehydratisiert wird und in einer zweiten Stufe durch Gefriertrocknung das Gewebe weiter dehydratisiert wird.

Mit diesem zweistufigen Verfahren ist es möglich, eine schnellere sowie arbeits- und kostengünstigere Entwässerung zu erreichen unter gleichzeitigem Erhalt der nativen Struktur, insbesondere der inneren Oberfläche, sowie der Elastizität des
35

1

5

10

15

kollagenen Materials. Die Zahl der Extraktionsschritte mit dem organischen Lösemittel kann deutlich erniedrigt werden, verglichen mit einem Konservierungsverfahren, bei dem ausschließlich mit organischen Lösemitteln dehydratisiert wird. Dadurch wird das Konservierungsverfahren wesentlich verkürzt, Lösemittel eingespart und folglich weniger Lösemittel der Recyclierung zugeführt sowie häufiges arbeitsaufwendiges Auswechseln des mit Wasser angereicherten Lösemittels gegen frisches Lösemittel eingespart. Die Gefriertrocknungsstufe bietet zusätzlich den Vorteil der einfachen Handhabung durch die apparative voll automatisierte Trocknung. Die eingangs genannten Nachteile der Gefriertrocknung treten bei dem erfindungsgemäßen Verfahren überraschender Weise nicht auf.

20

Als biologische Gewebe können beim erfindungsgemäßen Verfahren humane oder tierische Gewebe verwendet werden, zum Beispiel Haut, Dura mater, Fascia lata, Sehnen, Gefäße, Knorpel, Pericard, Knochen sowie aus Knochen hergestellte Platten, Nägel, Stifte, Schrauben. Diese Gewebe bestehen aus Kollagen oder aus Kollagen und mineralischen Bestandteilen. Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Transplantate stehen dem Chirurgen jederzeit zur Verfügung.

30

35

Vorzugsweise wird in der ersten Stufe das Gewebe auf einen Wassergehalt im Bereich von 10 Gew.-% bis 25 Gew.-% mit dem organischen, mit Wasser mischbaren Lösemittel dehydratisiert. Bei Weich-Geweben, wie zum Beispiel Haut, Dura mater, Fascia lata, wird vorzugsweise auf einen Wassergehalt im Bereich von 17 Gew.-% bis 20 Gew.-% dehydratisiert. Bei Hart-Geweben, wie Knochen, insbesondere Spongiosa Knochen, wird vorzugsweise auf einen Wassergehalt im Bereich von 10 Gew.-% bis 15 Gew.-% entwässert. Dabei wird, wie zu erwarten, die Struktur des nativen Gewebes erhalten. Überraschend ist jedoch, daß die sich anschließende Gefriertrocknung in der zweiten Stufe zur weiteren Dehydratisierung bis auf den gewünschten möglichst niedrigen

1

Wassergehalt von unter 8 Gew.-% sich nicht negativ auf die Gewebestruktur auswirkt.

5

10

Als Lösemittel können in an sich bekannter Weise zum Beispiel Methanol, Ethanol, Propanol, Isopropanol, Aceton, Methylethylketon oder deren Gemische verwendet werden. Bevorzugt wird Aceton als organisches, mit Wasser mischbares Lösemittel eingesetzt. Das verwendete Lösemittel soll einen möglichst niedrigen Wassergehalt aufweisen, vorzugsweise sollte es wasserfrei sein. Die Dehydratisierung mit dem Lösemittel wird bei Temperaturen im Bereich von 0°C bis 70°C je nach verwendetem Lösemittel durchgeführt. Vorzugsweise erfolgt die Dehydratisierung der ersten Stufe bei Raumtemperatur.

15

20

Vorzugsweise wird das Gewebe nach der Dehydratisierung der ersten Stufe einem Vakuum ausgesetzt, bevor es auf Temperaturen von ca. -25°C bis -40°C tiefgefroren wird. Dadurch wird das organische Lösemittel weitgehend aus dem Gewebe entfernt.

30

35

Bei der Dehydratisierung insbesondere von Spongiosa Knochen kann es vorteilhaft sein, in der ersten Stufe während der Dehydratisierung mit dem organischen Lösemittel gleichzeitig eine Behandlung mit Ultraschall, Vibratoren oder Schüttlern vorzunehmen. Dies fördert ein besseres Eindringen des Lösemittels in die feinen Kanäle des Spongiosa Knochens und dadurch die Entfettung und Dehydratisierung. Zu dem gleichen Zweck kann auch ein Überdruck, alternierender Druck oder Unterdruck angelegt werden. Ferner kann es vorteilhaft sein, vor dem ersten und nach jedem Extraktionsschritt eine Vakuumbehandlung vorzunehmen, bevor im nächsten Schritt mit frischem Lösemittel dehydratisiert wird. Auch dies fördert die Entfettung und einen besseren Austausch des wasserhaltigen organischen Lösemittels in den Kanälen gegen frisches organisches Lösemittel. Alle diese Maßnahmen können auch bei Weich-Geweben vorgenommen

1

werden.

5

Die Gefriertrocknung in der zweiten Stufe erfolgt in einer üblichen Gefriertrocknungsanlage. Darin wird das teilweise dehydratisierte Gewebe allmählich auf Temperaturen von beispielsweise -25°C bis -40°C gebracht und das im Gewebe entstandene Eis durch Anlegen eines Vakuums durch Sublimation entfernt.

10

Wie weiter oben bereits ausgeführt, wird vorzugsweise vor der Gefriertrocknung, d.h. vor dem Abkühlen des Gewebes auf tiefe Temperaturen, ein Vakuum angelegt. Dadurch wird das Lösemittel zu einem Teil aus dem Gewebe entfernt. Daran schließt sich die Gefriertrocknung an.

15

Die Erfindung wird an Hand der folgenden Beispiele und der Figuren 1 und 2 näher erläutert. Die Figuren 1 und 2 sind Diagramme, in denen der zeitliche Verlauf der Dehydratisierung der Gewebe in den Beispielen gezeigt ist. Auf der Abszisse ist die Zeit in Stunden bzw. Tagen und auf der Ordinate der Wassergehalt in Gew.-%, bezogen auf das Gesamtgewicht des zu dehydratisierenden Materials, aufgetragen.

20

Beispiel 1

Dura mater wird dem menschlichen Körper entnommen und in geeigneter, dem Fachmann bekannter Weise von antigenen Stoffen und Enzymen befreit. Zur Konservierung werden die so gereinigten Gewebestücke zweimal je sechs Stunden lang durch Einlegen in wasserfreies Aceton bei Raumtemperatur behandelt. Die Lösemittelmenge beträgt jeweils 500% des Naßgewichts des Gewebes. Dabei erfolgt eine Entquellung des Gewebes von 0,65 mm auf 0,57 mm. Der Wassergehalt beträgt nach Abschluß dieser ersten Dehydratisierungsstufe 20 Gew.-%.

30

35

In der zweiten Stufe wird das Gewebe in einer Gefriertrocknungsanlage während 3 Stunden auf -40°C abgekühlt. Danach wird ein Vakuum von 1,2 mbar angelegt zur Entfernung des im

1

Gewebe gebildeten Eises durch Sublimation. Die Stellplatten-
temperatur beträgt 35°C. Der Wassergehalt beträgt nach der
5 zweiten Stufe, die insgesamt 15 Stunden dauert, 6 Gew.-%. Die
Dicke des Gewebes beträgt 0,54 mm und die innere Oberfläche
20 m²/g. Der Dehydratisierungsverlauf ist in Figur 1 gezeigt.

10

Nach dem Verpacken in feuchtigkeitsdichten Beuteln und Steri-
lisieren mit Gammastrahlen mit einer Minstdosis von 15 Kgry
ist die Dura mater-Konserve praktisch unbeschränkt lagerfähig
und für Transplantationen gebrauchsfertig.

15

Wird stattdessen die Dehydratisierung der Dura mater aus-
schließlich mit Aceton auf denselben Wassergehalt von 6 Gew.-%
durchgeführt, müssen drei Extraktionsschritte von jeweils 12
Stunden durchgeführt werden.

Beispiel 2

20

Ein Spongiosa Knochen wird in geeigneter, dem Fachmann bekann-
ter Weise präpariert. Zur Konservierung wird der präparierte
Knochen fünfmal je 24 Stunden mit wasserfreiem Aceton bei
Raumtemperatur behandelt. Die Lösemittelmenge beträgt jeweils
500% des Naßgewichts des Knochens. Nach dieser Behandlung be-
trägt der Wassergehalt 12 Gew.-%. Anschließend wird in der
zweiten Stufe der Knochen während 3 Stunden auf -40°C abge-
kühlt und dann ein Vakuum von 1,2 mbar angelegt zur Entfernung
des im Knochen gebildeten Eises durch Sublimation. Die Stell-
plattentemperatur beträgt 35°C. Der Wassergehalt beträgt nach
30 der zweiten Stufe, die insgesamt 48 Stunden dauert, 2 Gew.-%.
Der Dehydratisierungsverlauf ist in Figur 2 gezeigt.

35

Wird stattdessen die Dehydratisierung des Spongiosa Knochens
ausschließlich mit Aceton durchgeführt, so sind bis zu 20 Ex-
traktionsschritte von jeweils 24 Stunden erforderlich, um auf
denselben Wassergehalt zu kommen. Dabei sind ca. 60 l Aceton
pro 1 kg Knochen erforderlich.

B 3765 -T/D1

Patentansprüche

1. Verfahren zum Dehydratisieren von biologischen Geweben zur Herstellung von Transplantat-Konserven, bei dem in einer ersten Stufe mit einem organischen, mit Wasser mischbaren Lösemittel das Gewebe teilweise dehydratisiert wird und in einer zweiten Stufe durch Gefriertrocknung das Gewebe weiter dehydratisiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem in der ersten Stufe auf einen Wassergehalt im Bereich von 10 Gew.% bis 25 Gew.-% dehydratisiert wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem in der ersten Stufe mit Methanol, Ethanol, Propanol, Isopropanol, Aceton, Methylethylketon oder deren Gemischen dehydratisiert wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei dem in der ersten Stufe bei einer Temperatur von 0°C bis 70°C dehydratisiert wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, bei dem vor der zweiten Stufe das Gewebe einer Vakuumbehandlung unterworfen wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, bei dem in der ersten Stufe vor dem ersten und nach jedem Extraktionsschritt mit dem organischen Lösemittel das Gewebe einer

1

Vakuumbehandlung unterworfen wird.

5 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, bei dem in der ersten Stufe während der Extraktion mit dem organischen Lösemittel das Gewebe einer Behandlung mit Ultraschall, einem Vibrator oder Schüttler unterworfen wird.

10 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, bei dem in der ersten Stufe während der Extraktion mit dem organischen Lösemittel ein Überdruck, alternierender Druck oder Unterdruck angelegt wird.

15

20

30

35

1

B 3765 -T/D1

5

Zusammenfassung

10

Es wird ein zweistufiges Verfahren zum Dehydratisieren von biologischen Geweben zur Herstellung von Transplantat-Konserven beschrieben. Dabei wird in einer ersten Stufe mit einem organischen, mit Wasser mischbaren Lösemittel das Gewebe teilweise dehydratisiert. In einer zweiten Stufe wird das Gewebe durch Gefriertrocknung weiter dehydratisiert.

15

20

30

35

Fig. 1

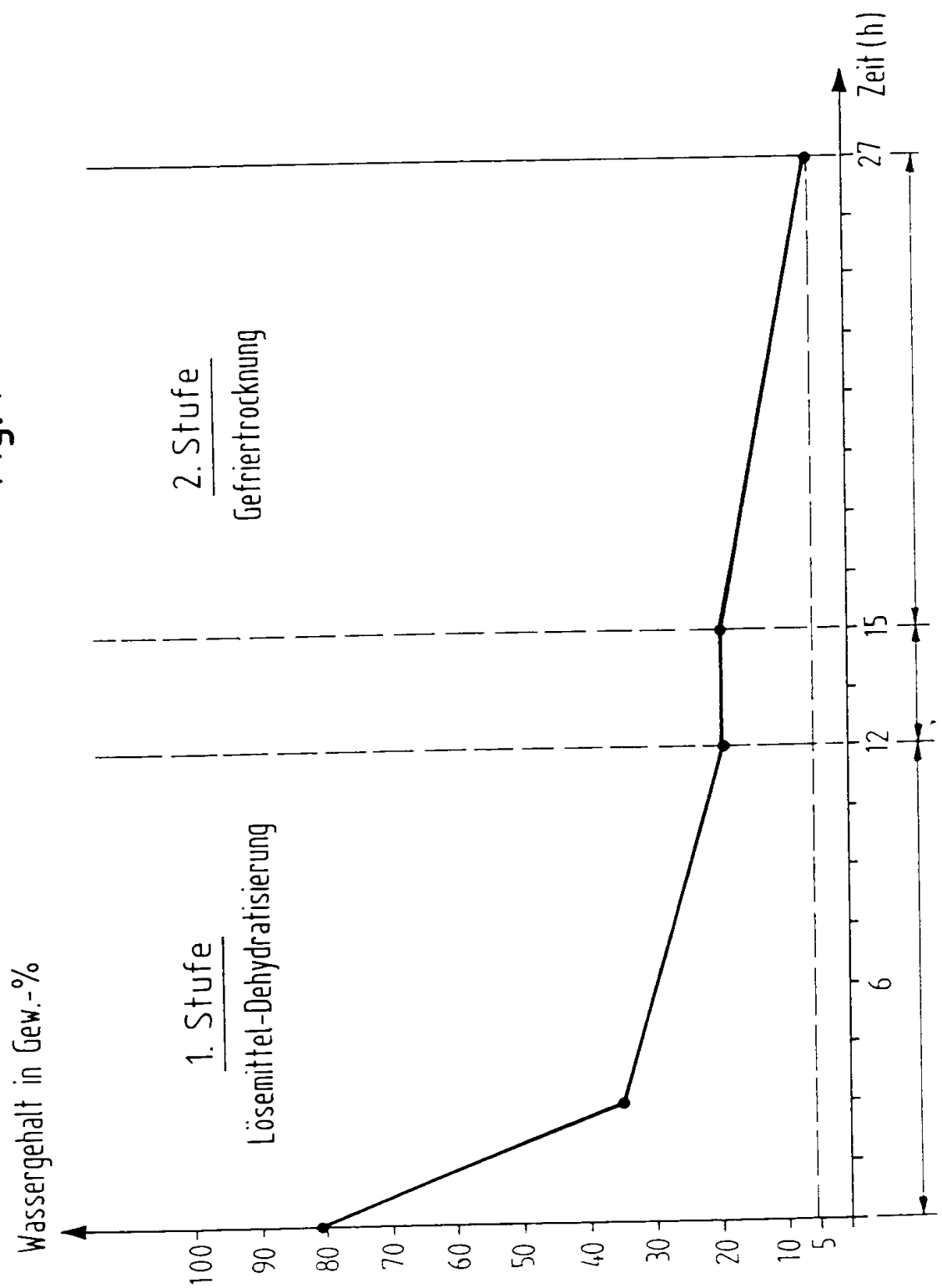


Fig. 2

